

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

428.1014



Re: Application of: **HAHM, Kyung-Soo, et al.**

Serial No.: to be assigned

Filed: herewith

For: **NOVEL PEPTIDES WITH INCREASED + CHARGE AND
HYDROPHOBICITY BY SUBSTITUTING ONE OR MORE
AMINO ACIDS OF CA-MA PEPTIDE AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING
THEREOF**

LETTER REGARDING PRIORITY

Assistant Commissioner
for Patents
Washington, D.C. 20231

February 22, 2002

Sir:

Applicants hereby claim priority of Korean Patent Application No. 2001-57837 filed
September 19, 2001. A certified copy thereof is attached.

Respectfully submitted,

ROBERTS & MERCANTI, L.L.P.

Michael N. Mercanti
Reg. No. 33,966

ROBERTS & MERCANTI, L.L.P.
P.O. Box 3156
105 Lock Street, Suite 203
Newark, New Jersey 07103
Phone: 973-621-0660
Fax: 973-621-0774

"Express Mail" mailing label no. EL 869 002 201 US
Date of Deposit February 22, 2002
I hereby certify that this correspondence and/or fee
is being deposited with the United States Postal Service
"Express Mail Post Office to Addressee" service under 37
CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope
addressed to: "Assistant Commissioner for Patents,
Washington, DC 20231".

ROBERTS & MERCANTI, L.L.P.

By:

Michael N. Mercanti



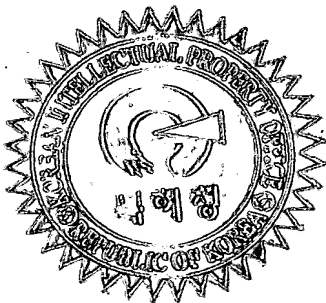
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 특허출원 2001년 제 57837 호
Application Number PATENT-2001-0057837

출원년월일 : 2001년 09월 19일
Date of Application SEP 19, 2001

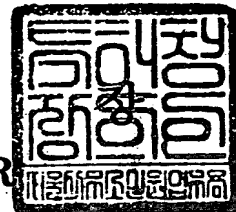
출원인 : 학교법인조선대학교
Applicant(s) Chunsun University Co., Ltd.



2002 년 02 월 05 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2001.09.19
【발명의 명칭】	CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 신규한 펩타이드 및 그를 포함하는 약학적 조성물
【발명의 영문명칭】	Novel peptides with increased + charge and hydrophobicity by substituting one or more amino acids of CA-MA peptide and pharmaceutical compositions containing thereof
【출원인】	
【명칭】	학교법인 조선대학교
【출원인코드】	2-1999-900160-6
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	함경수
【성명의 영문표기】	HAHM, Kyung-Soo
【주민등록번호】	460313-1000210
【우편번호】	120-757
【주소】	서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 104동 603호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이동건
【성명의 영문표기】	LEE, Dong Gun
【주민등록번호】	650320-1690815
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 102동 1106 호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박윤경
 【성명의 영문표기】 PARK, YoonKyung
 【주민등록번호】 710509-2662138
 【우편번호】 515-891
 【주소】 전라남도 장성군 장성남면 분향리 876-3
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김희남
 【성명의 영문표기】 KIM, Hee Nam
 【주민등록번호】 730219-2628217
 【우편번호】 519-800
 【주소】 전라남도 화순군 화순읍 만연리 244번지 부영아파트 506동 1313호
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 2
 【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
 리인 이원
 회 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	14 면	14,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	8 항	365,000 원
【합계】	408,000 원	
【감면사유】	학교	
【감면후 수수료】	204,000 원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통	

【요약서】**【요약】**

본 발명은 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 펩타이드 및 그를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 **서열번호 1**로 기재되는 CA-MA 접합 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 + 전하를 띄는 아미노산과 소수성을 나타내는 아미노산으로 치환시켜 제조한 합성 펩타이드 및 그를 포함하는 항균, 항진균 및 항암용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 합성 펩타이드는 세포독성이 없고 탁월한 항균, 항진균 및 항암 활성을 나타내므로 인체에 안전한 항생제 및 항암제로 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 6

【명세서】

【발명의 명칭】

CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 신규한 펩타이드 및 그를 포함하는 약학적 조성물{Novel peptides with increased + charge and hydrophobicity by substituting one or more amino acids of CA-MA peptide and pharmaceutical compositions containing thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 합성 펩타이드를 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균체에 처리한 다음 LB 아가(agar) 배지에 도말하여 생균수를 확인한 사진이고,

A ; 양성 대조군,

B ; CA-MA,

C ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

도 2는 본 발명의 합성 펩타이드를 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 균체에 처리한 다음 NB+0.5% NaCl 아가 배지에 도말하여 생균수를 확인한 사진이고,

A ; 양성 대조군,

B ; CA-MA,

C ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

도 3은 본 발명의 합성 펩타이드를 바실러스 서브틸리스 균체에 처리한 다음 주사전자현미경으로 관찰하여 확인한 사진이고,

A ; 양성 대조군,

B ; CA-MA,

C ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

도 4는 본 발명의 합성 펩타이드를 슈도모나스 에루지노사 균체에 처리한 다음 주사전자현미경으로 관찰하여 확인한 사진이고,

A ; 양성 대조군,

B ; CA-MA,

C ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

도 5는 본 발명의 합성 펩타이드를 바실러스 서브틸리스 균체에 처리한 다음 지질막의 역동적 상태를 나타낸 그래프이고,

A ; 바실러스 서브틸리스 균체에 대한 지질막의 역동적 상태,

B ; 슈도모나스 에루지노사 균체에 대한 지질막의 역동적 상태,

● ; CA-MA,

○ ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

도 6은 본 발명의 합성 펩타이드의 세포에 대한 항암활성을 나타낸 그래프이다.

A ; Calu-6 세포주에 대한 항암활성,

B ; Jurkat 세포주에 대한 항암활성,

C ; SNU 601 세포주에 대한 항암활성,

● ; CA-MA,

○ ; 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<24> 본 발명은 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 펩타이드 및 그를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 접합 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 + 전하를 띄는 아미노산과 소수성을 나타내는 아미노산으로 치환시켜 제조한 합성 펩타이드 및 그를 포함하는 항균, 항진균 및 항암용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<25> 세균의 감염은 인간의 질병에서 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나인데, 불행하게도 항생제의 남용으로 인하여 세균의 항생제 저항성(resistance)이 야기되었다. 실제로, 세균이 새로운 항생제에 저항성을 나타내는 속도는 새로운 항생제의 유사체가 개발되는 속도보다 훨씬 더 빨리 일어난다. 예를 들면, 생명에 위협을 가할 수 있는 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 마이코박테리움 투버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 등의 세균 종들은 지금까지 알려진 모든 항생제에 대한 저항력을 키워왔다(Stuart B. Levy, *Scientific American*, 1998, 46-53).

<26> 항생제에 대한 내성(tolerance)은 항생제에 대한 저항성(resistance)과는 구별되는 현상인데, 1970년대에 뉴모코커스(*Pneumococcus sp.*)에서 최초로 발견이 되었으며 페니실린의 작용 기작에 대한 중요한 단서를 제공하였다(Tomasz et al., *Nature*, 1970, 227, 138-140). 내성을 보이는 종은 통상적인 농도의 항생제 존재하에서는 성장을 멈추지만 결과적으로 죽지는 않는다. 내성은 항생제가 세포벽 합성 효소를 저해할 때 오토라이신(autolysin) 등과 같은 세균의 자가분해(autolytic) 효소의 활성이 일어나지 않기 때문에 생기는데, 이러한 사실은 페니실린이 내인성 가수분해 효소(endogenous hydrolytic enzyme)를 활성화시킴으로써 세균을 죽이며 세균은 또한 이들의 활성을 억제해서 항생제 치료시에도 생존하는 결과를 나타내게 된다.

<27> 세균이 여러 가지 항생제에 대해 내성을 가지는 것은 임상적으로 대단히 중요한데, 이는 내성 세균을 박멸하는 것이 불가능하게 되면 임상적인 감염에서 항생제 치료의 효용이 떨어지기 때문이다(Handwerger and Tomasz, *Rev. Infec. Dis.*, 1985, 7, 368-386). 아울러, 내성이 생기는 것은 항생제에 대한 저항성이 생기게 되는 선행조건이라고 간주되는데 이것은 항생제 치료에도 불구하고 살아남는 균주가 생기기 때문이다. 이러한 균주는 항생제에 저항성을 가지는 새로운 유전 요소를 획득해서 항생제의 존재 하에서도 계속 성장하게 된다. 실제로 모든 저항성을 보이는 세균들은 내성도 가지고 있는 것으로 알려져 있으므로(Liu and Tomasz, *J. Infect. Dis.*, 1985, 152, 365-372), 이러한 항생제 저항성을 가지는 세균을 죽일 수 있는 신규한 항생제의 개발이 필요하다.

<28> 작용 기작의 측면에서 내성은 크게 두가지 경로로 이루어지는데, 첫 번째는 모든 세균에 있어서 성장속도가 감소할 때 일어나는 외형적(phenotypic) 내성이며(Tuomanen

E., *Revs. Infect. Dis.*, 1986, 3, S279-S291), 두 번째는 특정 세균에서 일어나는 돌연변이에 의한 유전적인 내성이다. 두 가지 경우 모두에 있어서 기본적인 현상은 오토라이신 활성의 하부조절(down regulation)이 일어난다는 것인데, 이러한 하부조절은 외부 자극에 대한 외형적인 내성일 경우에는 일시적이며, 세포 용혈을 조절하는 경로의 변화를 야기하는 돌연변이가 일어난 유전적인 내성의 경우에는 영구적이다. 가장 간단한 유전적인 내성의 경우는 오토라이신 효소에 결손이 일어나는 것인데, 확실하지 않은 여러 가지 이유로 인해서 이러한 자살 효소의 결손에 의해 내성을 가지는 균주가 임상적으로 발견된 적은 없으며, 오히려 임상적인 내성은 오토라이신의 활성을 조절함으로써 이루어진다(Tuomanen et al., *J. infect. Dis.*, 1988, 158, 36-43).

<29> 상기에서 살펴본 바와 같이, 항생제에 저항성을 나타내는 세균들과 싸우기 위해서는 새로운 항생제의 개발이 필요하며, 아울러 오토라이신 활성과는 독립적으로 작용하는 새로운 항생제의 개발이 필요하다. 또한, 그러한 새로운 항생제를 세균의 감염과 염증 치료에 효과적으로 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이 필요하다.

<30> 한편, 세균은 펩타이드나 작은 유기물 분자들을 합성해서 이웃하는 세균을 죽일 수 있는데, 이러한 박테리오신(bacteriocin)들은 구조적으로 세부류로 분류된다. 첫 번째는 란티바이오틱스(lantibiotics)이며 두 번째는 비란티바이오틱스(nonlantibiotics)이고 세 번째는 신호 펩타이드(signal peptide)에 의해 분비되는 것들이다(Cintas et al.,

J. Bad., 1998, 180, 1988-1994). 곤충을 포함하는 동물들 역시 자연적으로 생성되는 펩타이드 항생제를 생산하는데(Bevins et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, 59, 395-414), 상기의 항생제는 구조적으로 세 개의 그룹으로 나뉘어진다. 첫 번째는 시스테인이 풍부한(cysteine-rich) β -시트(sheet) 펩타이드이고, 두 번째는 α -회전형(helical)의 양친화성 분자이며, 세 번째는 프롤린이 풍부한(proline-rich) 펩타이드이다(Mayasaki et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, 9, 269-280). 이들 항균 펩타이드들은 숙주방어 및 선천적 면역계에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Boman, H. G., *Cell*, 1991, 65, 205; Boman, H. G., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, 13, 61). 이러한 항균 펩타이드들은 아미노산 서열에 따라 다양한 구조를 갖는데, 이들 구조 중 가장 많은 것은 곤충에서 발견된 항균 펩타이드인 세크로핀(cecropin)과 같이 시스테인(cysteine) 잔기가 없고 양친화성 알파 나선형을 형성하는 구조이다.

<31> 이러한 펩타이드 중에서도 양친화성 펩타이드의 항균활성에 대해서 많은 연구가 이루어졌으며, 이를 이용해 세균에 대한 항생제를 개발하려는 연구들이 많이 시도되었다. 지금까지 보고된 양친화성 펩타이드로는 마가이닌 2(magainin 2, MA), 세크로핀 A(cecropin A, CA) 및 멜리틴(melittin, ME) 펩타이드 등이 있다.

<32> 세크로핀 계열의 양친화성 펩타이드는 초파리에서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은 창자에서도 발견되었는데, 세크로핀 A는 항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었으며(Boman, H. G. and Hultmark, D.,

Annu. Rev. Microbiol., 1987, 41, 103), 또한 마가이닌 2 펩타이드는 세포독성이 없으면서 항균활성과 함께 항진균, 항암 및 항-원생생물 효과가 있다고 알려져 있다 (Zasloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 5449). 아울러, 이러한 두 펩타이드의 일부 서열들을 재조합시킨 접합 펩타이드(conjugation peptide)를 제조하여 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드를 제조할 수 있음이 알려져 있다(Chan, H. C., et al., *FEBS Lett.*, 1989, 259, 103; Wade, D., et al., 1992, 40, 429).

<33> 이에, 본 발명자들은 양친화성을 갖는 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합한 펩타이드(CA-MA)를 주형으로 하여 아미노말단 부위에 플러스 전하를 띤 아미노산과 소수성 성질을 띤 아미노산의 배열을 가지는 신규한 합성 펩타이드를 설계하고 합성하였으며, 이와 같이 합성된 합성펩타이드의 항균, 항진균, 항암활성 및 세포 독성(용혈활성)을 확인하여 상기 합성 펩타이드가 항생제 및 항암제로 유용하게 이용될 수 있는 항생 펩타이드임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<34> 본 발명의 목적은 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합시켜 제조한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을

치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가되고 세포독성이 없으며 우수한 항균, 항진균 및 항암 활성을 가지는 펩타이드 및 그의 유도체를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <35> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세크로핀(cecropin A, CA)과 마가이닌(magainin 2, MA)을 접합시켜 제조한 **서열번호 1**로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 펩타이드 및 그의 유도체를 제공한다.
- <36> 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 및 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균, 항진균 및 항암용 약학적 조성물을 제공한다.
- <37> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <38> 본 발명은 세크로핀과 마가이닌을 접합시켜 제조한 **서열번호 1**로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 펩타이드 및 그의 유도체를 제공한다.
- <39> 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 양친화성 나선모양을 가진 CA의 1-8 아미노산 부위와 MA의 1-12 아미노산 부위를 접합한 **서열번호 1**로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위(hinge region)와 몇 개의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 합성 펩타이드이다.

<40> 본 발명의 펩타이드를 합성하기 위하여, 본 발명자들은 Fmoc 아미노기 보호 용기를 이용한 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하였다(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, 1963). 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위와 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 + 전극과 소수성 영역을 증가된 모든 합성 펩타이드가 될 수 있으며, 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하여 제조된 서열번호 2로 기재되는 펩타이드 및 그의 유도체가 바람직하다.

<41> 이와 같이 제조된 본 발명의 펩타이드를 분리·정제하고 그 순도를 확인한 결과 95% 이상의 순도를 나타내었으며, MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) 질량 분석법을 이용하여 얻은 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하므로 서열번호 2로 기재되는 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

<42> 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 및 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균, 항진균 및 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

<43> 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체가 항균, 항진균 및 항암용으로 사용될 수 있는지 확인하기 위하여, 먼저 본 발명자들은 본 발명에서 합성한 펩타이드의 항균 활성을

측정하였다. 항균 활성은 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 생육 최소저해 농도(minimal inhibitory concentration, 이하 "MIC"라 약칭함)를 측정하여 관찰하였다.

<44> 그람 양성균과 그람 음성균에 대하여 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 합성 펩타이드를 사용하여 각 균주의 MIC 값을 측정한 결과, 본 발명의 합성 펩타이드는 비교균으로 사용한 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 균주에 따라 4배 이상의 높은 항균 활성을 나타냄을 확인하였다(표 1 참조).

<45> 또한, 바실러스 서브틸리스와 슈도모나스 에루지노사를 대상으로 본 발명의 항생 펩타이드의 항균활성을 LB 아가 배지에서 확인한 결과, 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 항생 펩타이드는 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 탁월한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).

<46> 또한, 바실러스 서브틸리스와 슈도모나스 에루지노사를 대상으로 본 발명의 항생 펩타이드의 항균활성을 주사전자현미경에서 확인한 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 항생 펩타이드는 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 탁월한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).

<47> 또한, 바실러스 서브틸리스와 슈도모나스 에루지노사를 대상으로 본 발명의 항생 펩타이드 처리후 지질막의 역동적 상태를 확인한 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드는 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 탁월한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다(도 5 참조).

<48> 다음으로, 본 발명의 합성 펩타이드의 항진균 활성을 측정하기 위하여 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) 및 트리코스포론 베이젤라이(*Trichosporon beigelii*)를 대상으로 각 균주의 MIC 값을 MTT 분석법으로 측정한 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드는 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 2배 이상의 높은 항진균 활성을 나타냄을 확인하였다(표 2 참조).

<49> 또한, 본 발명의 항생 펩타이드가 암세포에 대한 항암 활성을 나타내는지 확인하기 위하여, 인간의 폐암 세포주인 Calu-6와 위암 세포주인 SNU 601 및 T 세포 림프종을 대상으로 항암 활성을 측정한 결과 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 합성 펩타이드는 비교군으로 사용한 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 강한 항암활성을 나타냄을 확인하였다(도 6 참조).

<50> 아울러, 본 발명자들은 본 발명의 펩타이드가 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여 합성 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사한 결과, CA-MA 접합 펩타이드와 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면에 양성 대조군으로 사용한 벌독인 멜리틴은 세포 독성이 매우 높게 나타남을 알 수 있었다(표 3 참조).

- <51> 상기의 결과로부터, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드는 탁월한 항균, 항진균 및 항암 효과를 나타낼 뿐만 아니라 세포독성이 없기 때문에 인체에 안전한 항균, 항진균 및 항암제로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- <52> 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 임상투여시에 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다.
- <53> 즉, 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <54> 또한, 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이팅 물질(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

<55> 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체의 유효용량은 0.1~2 mg/kg이고, 바람직하기로
는 0.5~1 mg/kg 이며, 하루 1~3회 투여될 수 있다.

<56> 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 펩타이드 및 그의 유도체의 총 유효량은
거환(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 확산(infusion) 등에 의해 단일 투여
량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간
투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다.
상기 펩타이드 및 그의 유도체의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수 뿐만 아니라 환자
의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이
므로, 이러한 점을 고려할 때 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 펩타이
드 및 그의 유도체의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결
정할 수 있을 것이다.

<57> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

<58> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에
한정되는 것은 아니다.

<59> <실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제

<60> 본 발명자들은 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 항생 펩타이드를 합성하기 위하
여, Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용한 메리펠드

(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하였다(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2149). 본 발명에서는 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 링크 아미드(Rink Amide) MBHA-레진(Resin)을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이 $-OH$ 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin(SynPep Corporation)을 출발물질로 사용하였다.

Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 사슬의 연장은 N-hydroxybenzotriazole(HOBT)-dicyclo-hexycarbodiimide (DCC)법에 의하였다. 먼저, 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 커플링 시킨 후, 20% 피페리딘(piperidine)/NMP(N-methylpyrrolidone) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 DCM(dichloromethane)으로 여러번 세척한 다음 질소 가스로 건조시켰다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid)-페놀(phenol)-티오아니솔(thioanisole)- H_2O -트라이소프로필실란(triisopropylsilane) (85: 5: 5: 2.5: 2.5, vol/vol) 용액을 가하고 2 내지 3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음 디에틸에테르(diethylether)로 펩타이드를 침전시켰다. 상기의 방법으로 얻은 크루드(crude) 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴(acetonitrile) 농도구배(gradient)에서 정제형 역상(reverse phase, RP)-HPLC 칼럼(Delta Pak, C_{18} 300Å, 15, 19.0mm × 30 cm, Waters)을 이용하여 정제하였다. 합성된 펩타이드를 6 N-HCl로 110°C에서 가수분해시켜 잔사를 감압농축한 후, 0.02 N-HCl에 용해시켜 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 이렇게 조성된 펩타이드의 순도를 확인한 결과 95%의 순도를 나타내었으며, MALDI 질량 분석법(Hill, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 1991, 5, 395)을 이용하여 얻은 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하므로 서열번호 2로 기재되는 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

<61> <실험예 1> 합성 펩타이드의 항균활성 측정

<62> <1-1> 생육 최소저해농도 측정

<63> 상기 실시예 1에서 제조된 항생 펩타이드의 항균 활성을 측정하기 위하여, 먼저 본 발명자들은 균체가 분열되지 않는 펩타이드의 최소 농도인 MIC 값을 측정하였다.

<64> 본 발명자들은 항균 활성 측정을 위하여 그람 양성균으로써 바실러스 서브틸리스(KCTC 1918)와 스타필로코쿠스 에피더미디스(KCTC 1917)를, 그람 음성균으로 슈도모나스 에루지노사(KCTC 1637)와 살모넬라 타이피무리움(KCTC 1926)을 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양 받아 사용하였으며, 각 균주를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음 1% 박토 펩톤 배지로 1×10^4 세포/100 μl 의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종하였다. 실시예 1에서 합성한 항생 펩타이드 및 비교균으로서 CA-MA 펩타이드를 각각 25 μM /웰(well) 부터 1/2배씩 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37°C에서 6시간 동안 배양하였고, 미세 적정(micro titrate) 플레이트 판독기를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<65> 【표 1】

그람 양성균 및 그람 음성균에 대한 합성 펩타이드의 항균 활성 측정 생육 최소저해농도 (μ M)				
	그람 양성균		그람 음성균	
	<i>B. 서브틸리스</i>	<i>S. 에피더미디스</i>	<i>P. 에루지노사</i>	<i>S. 타이피푸리움</i>
CA-MA	3.12	3.12	1.56	0.19
서열번호 2의 합성 펩타이드	0.78	1.56	0.78	0.097

<66> 그 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 항생 펩타이드는 그람 양성 및 그람 음성균 모두에서 CA-MA 펩타이드에 비해 균주에 따라 4배 이상의 높은 항균 활성을 나타냄을 확인하였다.

<67> <1-2> 항균 활성의 가시화

<68> 또한, 본 발명의 합성 펩타이드의 항균활성을 배지상에서 가시화하기 위하여, 본 발명자들은 슈도모나스 에루지노사와 바실러스 서브틸리스를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에 접종한 후 미드-로그 상(mid-log phase)까지 배양하였다. 구체적으로, 4×10^5 세포의 슈도모나스 에루지노사와 바실러스 서브틸리스에 각각 4μ M과 1μ M 농도의 합성 펩타이드를 섞은 후 37°C 에서 2시간 동안 배양하였고 배양액을 LB 플레이트에 도말하여 균주를 가시화시켰으며, 비교군으로는 CA-MA를 사용하였다.

<69> 그 결과, 그람 양성균인 바실러스 서브틸리스균에 아무것도 처리하지 않은 양성대조군에서는 많은 수의 콜로니(colony)를 발견할 수 있었고(도 1의 A) CA-MA를 첨가한 경

우에도 균이 조금 자랐으나(도 1의 B) 본 발명의 합성 펩타이드를 첨가한 경우에는 균의 성장이 완전히 억제되어 콜로니가 보이지 않음을 확인하였다(도 1의 C). 또한, 그람 음성균인 슈도모나스 에루지노사에 아무 것도 처리하지 않은 양성대조군에서는 많은 수의 콜로니(colony)를 발견할 수 있었고(도 2의 A), CA-MA를 첨가한 경우에도 균이 자랐으나(도 2의 B), 본 발명의 항생 펩타이드를 첨가한 경우에는 균의 성장이 완전히 억제되어 콜로니가 보이지 않음을 확인하였다(도 2의 C).

<70> 상기의 결과로부터, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드는 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 탁월한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다.

<71> <1-3> 항균 활성의 주사전자현미경 관찰

<72> 본 발명의 합성 펩타이드의 항균활성을 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

먼저, 본 발명자들은 그람 양성균으로써 바실러스 서브틸리스와 그람 음성균으로 슈도모나스 에루지노사를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에서 중간-로그 상(mid-log phase)까지 배양한 다음, 100 mM 염화나트륨(NaCl)을 포함하는 10 mM 농도의 인산나트륨 완충용액(Na-phosphate buffer, pH 7.4)에 10^8 세포/ml 균체 농도로 희석하였다. 상기 희석한 균주에 본 발명의 합성 펩타이드 및 비교균으로서 CA-MA 펩타이드를 바실러스 서브틸리스에는 0.78 μ M, 슈도모나스 에루지노사에는 1.56 μ M이 되도록 첨가한 후 37°C에서 30분간 배양을 하였다. 5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 용해시킨 0.2 M 인산나트륨 완충용액을 상기 균주에 동일한 부피로

첨가하여 4℃에서 2시간동안 고정시켰다. 상기 시료를 이소포어 필터(Isopore filters, 0.2 μ m pore size, Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과시킨 후 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 완충용액(Na-cacodylate buffer, pH7.4)으로 세척하였고, 필터에 1% 오스뮴 테록사이드(osmium tetroxide)를 처리한 후 나트륨 카코딜레이트 완충용액에 녹인 5% 슈크로즈(5% sucrose)로 세척하고 에탄올로 단계적으로 탈수시켰다. 이것을 동결건조와 골드코팅을 한 후 주사전자현미경(HITACHI S-2400, Japan)에서 관찰하였다.

<73> 그 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드를 바실러스 서브틸리스와 슈도모나스 에루지노사에 처리한 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과 대조군과 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 세포가 더 많이 파괴되었음을 확인하였다(도 3 및 도 4).

<74> <1-4> 역동적 측정

<75> 본 발명자들은 본 발명의 합성 펩타이드를 처리한 균주의 지질막의 역동적 상태를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 그람 양성균으로써 바실러스

서브틸리스와 그람 음성균으로 슈도모나스 에루지노사를 LB 배지(1% 박토 트립톤, 0.5% 박토 이스트 추출물, 1% 염화나트륨)에서 중간-로그 상까지 배양한 다음, 각 균주에 본 발명의 항생 펩타이드 및 비교균으로서 CA-MA 펩타이드를 6.25 μ M에서 0.097 μ M 농도까지 1/2배로 희석하여 섞은 후 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 시료를 0.25% 포르말데히드(formaldehyde)로 1시간동안 상온에서 고정을 시킨 후, 인산염완충용액(PBS, pH 7.4)으로 세척하였고 다시 액체 질소에 급속 냉동시켰다. 형광 표지를 위해 상기 시료에 인산염 완충용액(PBS, pH7.4)을 OD₄₅₀ = 0.25로 섞어준 다음, 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran)에 용해시킨 DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)를 10⁻⁴ M이 되게 첨가하여 37°C에서 45분간 배양하였다. 정상 형광 이방성(steady-state fluorescence anisotropy)은 분광형광계(spectrofluorometer, HITACHI F-3010, Tokyo, Japan)로 330 nm와 450 nm에서 형광세기를 측정하여 결정하였다.

<76> 그 결과, 본 발명의 **서열번호 2**로 기재되는 펩타이드를 바실러스 서브틸리스와 슈도모나스 에루지노사에 처리한 경우, DPH 표지 형광물질이 CA-MA 접합 펩타이드에 비해 15 - 20% 낮게 막에 끼워 있음을 확인하였다(도 5).

<77> <실험예 2> 합성 펩타이드의 항진균 활성 측정

<78> <2-1> MTT 분석

<79> 본 발명의 합성 펩타이드의 항진균 활성을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 병원성 진균인 캔디다 알비칸스(TIMM 1768)와 트리코스포론 베이젤라이(KCTC 7707)를 대상으로

MTT 분석을 수행하였다. 구체적으로, 96-웰 플레이트에 각종 진균을 포함한 PDB 배지 (20% 포테이토 인퓨전 프럼, 2% 박토 텍스트로즈) 100 μ l씩을 분주한 다음, 본 발명의 항생 펩타이드 및 비교군으로서 CA-MA 펩타이드를 각각 50 μ M/웰(well)부터 1/2배씩 희석하여 플레이트에 첨가한 후 다시 배양하였다. 5 mg/ml 농도의 MTT 용액 (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl- 2H-tetrazolium bromide) 10 μ l를 모든 웰에 첨가하여 다시 5-6시간 배양한 후, 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 포르마잔(formazan)을 0.04 N HCl-이소프로판올(isopropanol) 용액 100 μ l로 잘 용해시킨 후 ELISA 판독기(reader)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 발색되는 정도로 MIC 값을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

<표 2> 【표 2】

합성 펩타이드의 항진균 활성 측정 합성 펩타이드	생육 최소저해농도 (μ M)	
	C. 알비칸스	T. 베이젤라이
CA-MA	12.5	6.25
서열번호 2의 합성 펩타이드	6.25	3.25

<81> 그 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드의 항진균 활성을 CA-MA 접합 펩타이드와 비교하였을 때 C. 알비칸스의 경우와 T. 베이젤라이의 경우에는 CA-MA 접합 펩타이드보다 2배 정도의 높은 항진균 활성을 보이는 것을 확인하였다.

<82> <실험예 3> 항생 펩타이드의 항암 활성 측정

<83> 본 발명의 합성 펩타이드의 항암 활성을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 인간의 폐암 세포주인 Calu-6와 위암 세포주인 SNU 601, 및 T 세포 림프종인 Jurkat 세포주를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. 우선 2×10^5 세포/ml 농도의 각 세포주 90 μ l씩을 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이때, 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였다. 플레이트를 잘 흔든 후 3일간 CO₂ 배양기에서 배양하였고, 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 포르마잔을 0.04 N HCl-이소프로판올 용액 100 μ l로 잘 용해시켜 ELISA 판독기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합성 펩타이드를 처리한 웰의 흡광도 값을 합성 펩타이드를 처리하지 않는 대조군 세포가 들어 있는 흡광도 값으로 나눈 백분율로 본 발명의 항암 펩타이드의 항암 활성도를 나타내었다.

<84> 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이 본 발명의 합성 펩타이드는 실험한 모든 세포주에 대해서 CA-MA 접합 펩타이드보다 더 강하게 항암 활성이 나타남을 확인하였다. 본 발명의 합성 펩타이드는 1 μ M 농도까지는 항암 활성을 나타내지 않았으나 농도가 증가할수록 급격한 항암 활성을 나타내어 10 μ M 이상의 농도에서는 암세포의 성장을 완전히 억제하는 강한 항암 활성을 나타내었다.

<85> <실험예 4> 합성 펩타이드의 세포 독성 측정

<86> 본 발명의 합성 펩타이드가 세포독성을 나타내는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 합성 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다.

<87> 사람의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 희석하고 여기에 12.5 μ M/웰부터 1/2의 농도로 합성 펩타이드를 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1,000 g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 이때, 비교군으로는 CA-MA 펩타이드를 사용하였고, 양성대조군으로는 멜리틴을 사용하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤-X100을 첨가하여 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 합성 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

<88> **【수학적 식 1】** % 적혈구 파괴능(hemolysis) = $\left(\frac{\text{흡광도 A} - \text{흡광도 B}}{\text{흡광도 C} - \text{흡광도 B}} \right) \times 100$

<89> 상기 식에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액의 흡광도, 흡광도 B는 414 nm 파장에서 PBS의 흡광도 및 흡광도 C는 414 nm 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

<90> 상기 식에 의한 적혈구 파괴능의 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<91> **【표 3】**

합성 펩타이드의 세포 독성 측정 펩타이드	% 적혈구 파괴능 (μ M)							
	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.195	0.097
CA-MA	0	0	0	0	0	0	0	0
서열번호 2의 합성 펩타이드	0	0	0	0	0	0	0	0
멜리틴	100	100	95	93	31	0	0	0

<92> 그 결과, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 합성 펩타이드와 CA-MA 접합 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면에 양성 대조군으로 사용한 벌독인 멜리틴은 세포 독성이 매우 높게 나타남을 알 수 있었다.

<93> <실험예 5> 랫트에 대한 비경구투여 급성 독성실험

<94> 6주령의 특정병원체부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 2 마리씩의 동물에 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 펩타이드를 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 현탁하여 1 g/kg/15 ml의 용량으로 단회 비경구투여하였다. 시험물질 투여후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 시험 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 실험된 본 발명의 항생 펩타이드는 랫트에서 5 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 비경구투여 최소치사량(LD₅₀)은 10 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

【발명의 효과】

<95> 상기의 결과로부터, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 펩타이드 및 그의 유도체는 그람 양성균 및 그람 음성균 모두에서 탁월한 항균작용을 나타내었고, 진균에 대해서도

1020010057837

출력 일자: 2002/2/7

높은 항진균 활성을 나타내었으며 또한 세포독성을 나타내지 않으므로 인체에 안전한
항생, 항균 및 항암용으로 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 + 전극과 소수성 영역이 증가된 펩타이드 또는 그의 유도체.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 펩타이드 또는 그의 유도체.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항의 펩타이드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항 또는 제 2항의 펩타이드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항진균용 약학적 조성물.

【청구항 5】

제 1항 또는 제 2항의 펩타이드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항암용
약학적 조성물.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 7】

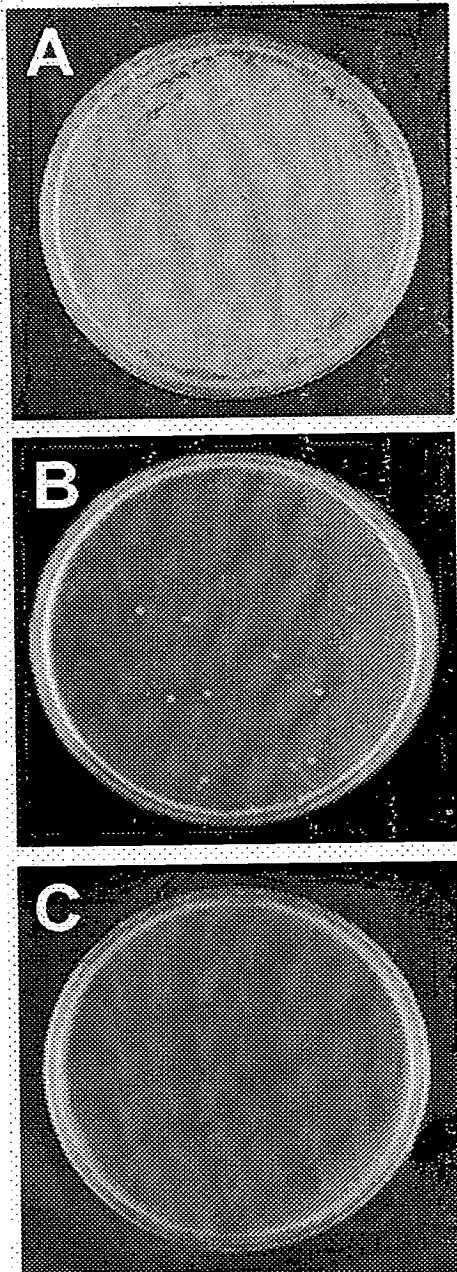
제 5항에 있어서, 상기 암은 위암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물

【청구항 8】

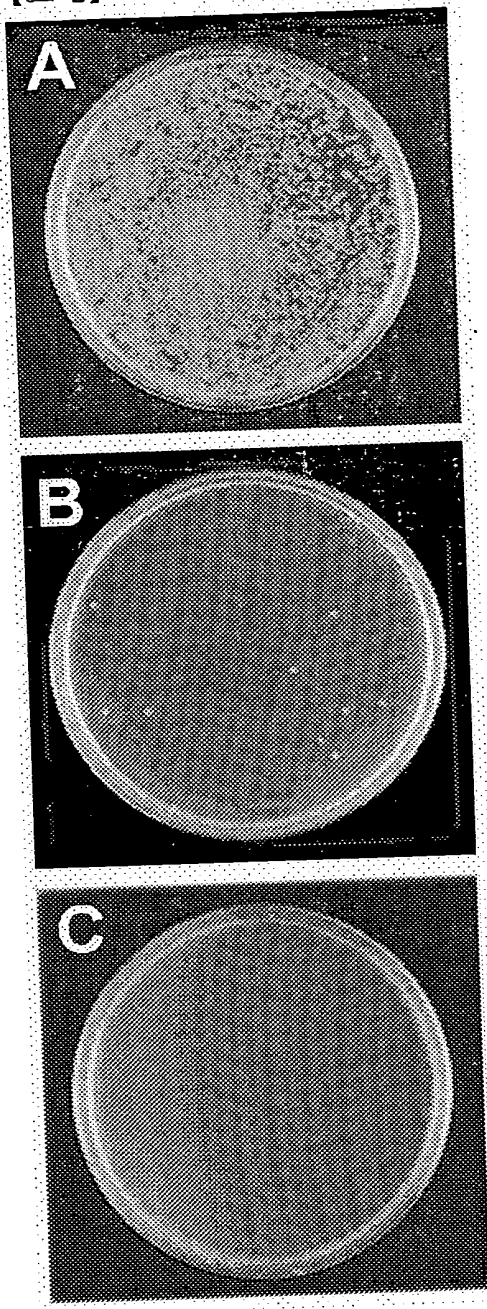
제 5항에 있어서, 상기 암은 림프종인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【도면】

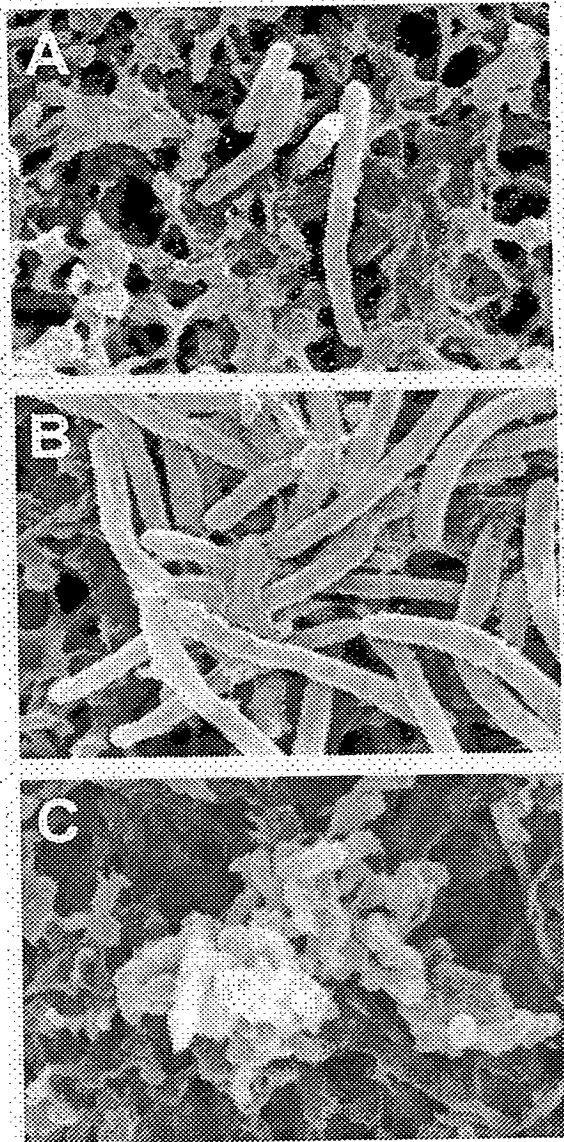
【도 1】



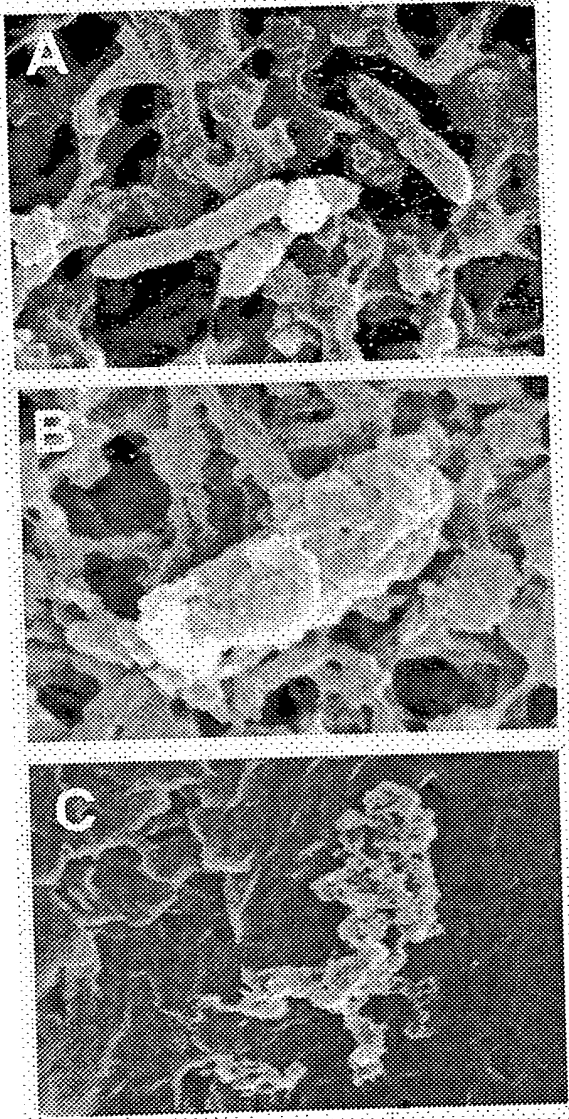
【도 2】



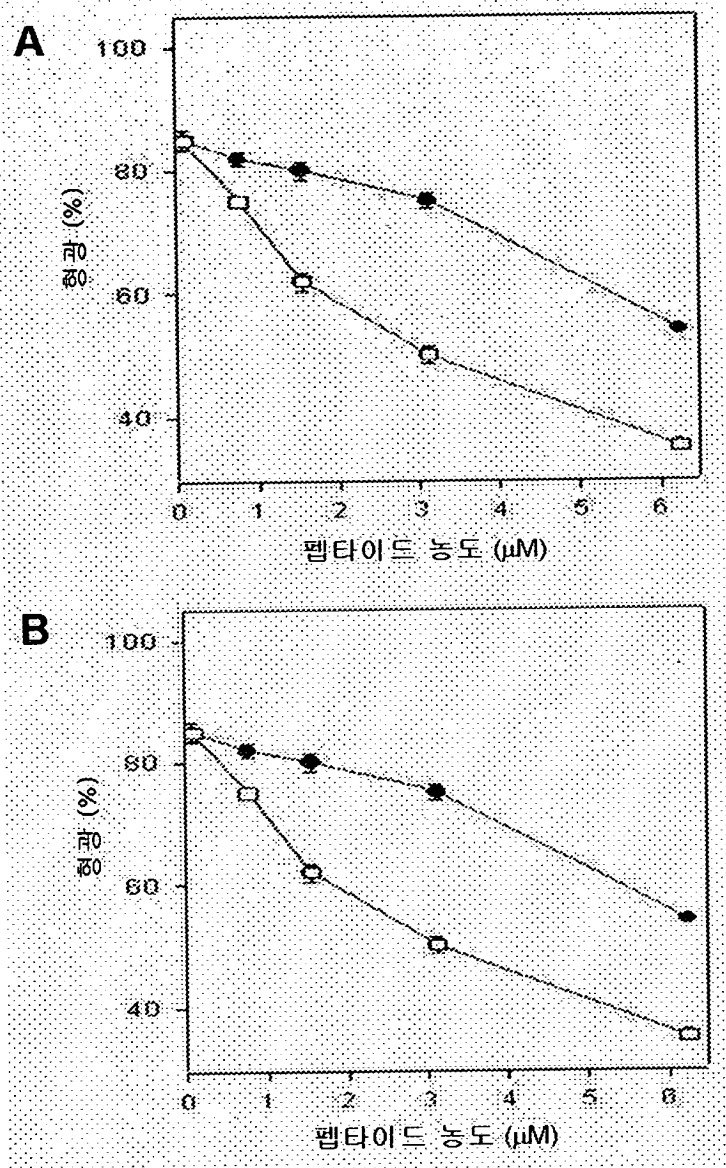
【도 3】



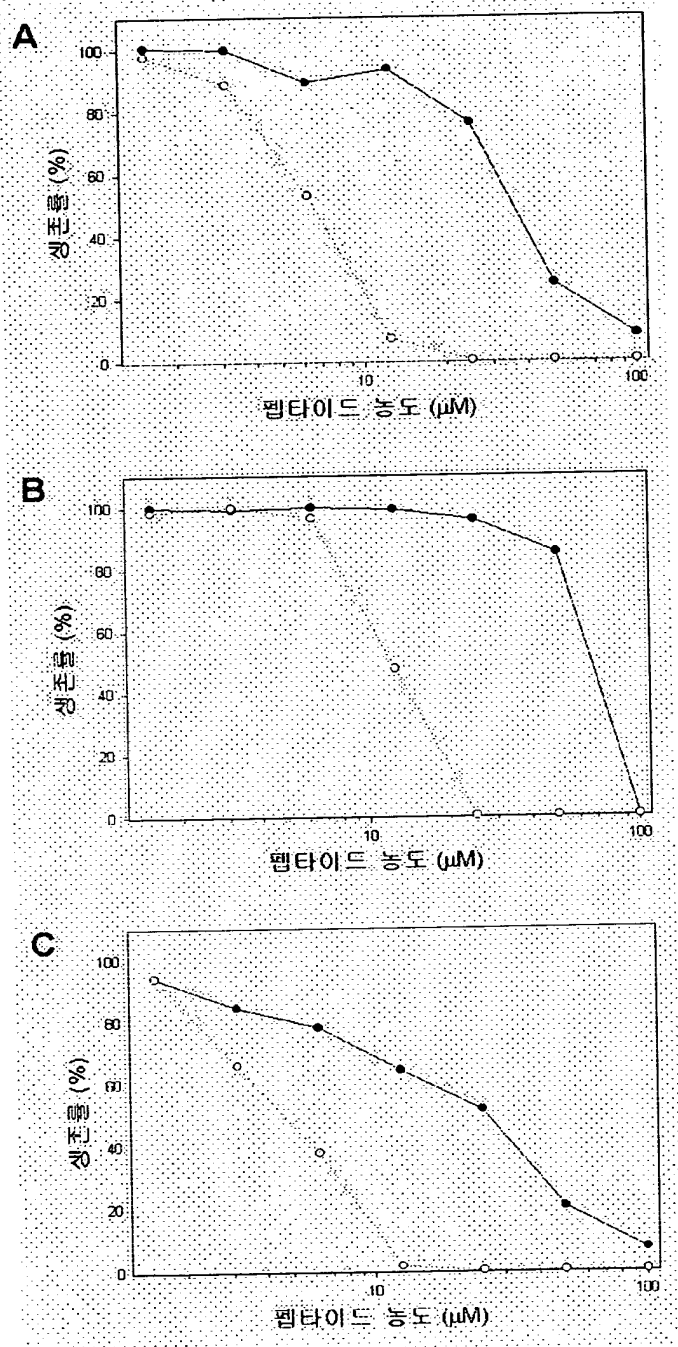
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【서열목록】

<110> Chosun University <120> Novel peptides with increased + charge and hydrophobicity by substituting one or more amino acids of CA-MA peptide

and pharmaceutical compositions containing thereof <130> 1p-09-03B

<160> 2 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 20 <212> PRT <213>

Artificial Sequence <220> <223> CA-MA peptide made by fusing 1-8 amino acid

of secropin A and 1-12 amino acid of magainin 2 <400> 1 Lys Trp Lys

Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser 1 5

10 15 Ala Lys Lys Phe 20 <210> 2 <211> 20

<212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> peptide with increased

+ charge and hydrophobicity by substituting amino acids of SEQ. ID. NO

1 with lysine and leucine <400> 2 Lys Trp Lys Lys Leu Leu Lys Lys Pro Pro

Pro Leu Leu Lys Lys Leu 1 5 10

15 Leu Lys Lys Leu 20